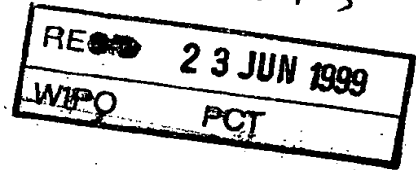


48  
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 99/02973

EP 99/2973

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

09/700391

Die Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme"

am 15. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 P und C 07 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 27. November 1998  
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident  
Im Auftrag

*W. Weber*

*Wehner*

Aktenzeich n: 198 21 866.4

# Beschreibung

5 Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich Reaktionen mit unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme und im besonderen ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, insbesondere von biologisch aktiven Peptiden, beispielsweise von Insulinen oder deren Analoga, von Proteinen, Oligosacchariden oder von Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen bzw. Vorläufern, beispielsweise Präproinsulinen, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme.

Die Herstellung von Humaninsulin und seiner Derivate ist über unterschiedliche Ansätze in der Literatur beschrieben. Neben der chemischen Synthese, die auf Grund der Komplexität des Zielmoleküls unwirtschaftlich ist, existieren weiterhin ein semisynthetisches sowie ein gentechnisches Verfahren.

Beim semisynthetischen Ansatz kommt es zu einem durch Trypsin katalysierten Austausch der C-terminalen Aminosäure der B-Kette des Schweineinsulins, der zur Bildung des Humaninsulins führt (H.-D. Jakubke et al., Angew. Chem., 97 (1985) 79).

Der gentechnische Ansatz zur Herstellung von Humaninsulin verläuft über die Stufe des Präproinsulins und seiner Derivate, die im Rahmen der Aufarbeitung ebenfalls einer tryptischen Spaltung unterzogen werden (B.H. Frank et al.,

Peptides: synthesis, structure, function, (1981) 729-738; Jonasson et al., Eur. J. Biochem., 236 2 (1996) 656-661; Kemmler et al., J. Biol. Chem., 246 (1971) 6786-6791).

Zur effizienteren Nutzung des Enzyms wurde für den semisynthetischen Ansatz ein Verfahren entwickelt, das den Einsatz von immobilisiertem Trypsin erlaubt (EP 0 294 851).

5 Für die Gewinnung von Insulinen oder dessen Analoga aus den entsprechenden, gentechnisch hergestellten Präproinsulinen ist bislang kein enzymatisches Verfahren bekannt, bei welchem das Enzym Trypsin immobilisiert vorliegt, so daß bei bekannten Verfahren einerseits für jeden neuen Reaktionsansatz neues Trypsin zugegeben werden muß und andererseits im Rahmen der Produktaufreinigung eine aufwendige Abreicherung des Enzyms notwendig ist.

Die tryptische Spaltung von Präproinsulin (PPI) ist eine komplexe, enzymkatalysierte Reaktion mit zahlreichen unerwünschten Folge- und Nebenreaktionen. Wie in Fig. 1 gezeigt, entstehen bei der tryptischen Spaltung von PPI auf Grund der zahlreichen reaktiven Stellen eine Vielzahl von Reaktionsprodukten, von denen die Verbindungen Arg(B31), Arg(B32)-Insulin ("di-Arg") und Arg(B31)-Insulin ("mono-Arg") als die eigentlichen Wertstoffe für die weitere Aufarbeitung anzusehen sind. Somit ist eine Abspaltung sowohl der Präsequenz als auch der "mittigen" (der im Präproinsulin zwischen der Sequenz der A-Kette und der Sequenz der B-Kette des Insulins angeordneten) C-Kette notwendig. Kommt es an anderen Stellen des PPIs zu Spaltreaktionen, so entstehen unerwünschte Nebenprodukte wie z. B. das Des(B30)-Insulin ("des-Thr").

25 Während die Spaltung mit nativem Trypsin zur vorwiegenden Bildung der beiden Wertstoffe führt, Arg(B31), Arg(B32)-Insulin ("di-Arg") und Arg(B31)-Insulin ("mono-Arg"), liefert der Einsatz von Trypsin-Immobilisaten auf der Grundlage konventioneller Träger wie z. B. Eupergit® C250L, Eupergit® C, Deloxan® ein unbefriedigendes Reaktionsmuster. Die beiden Wertstoffe di- und mono-Arg werden dabei in nur geringen Anteilen gebildet, während in erster Linie die unerwünschten Folge- bzw. Nebenprodukte (vornehmlich des-Thr) entstehen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich enzymkatalysierte Reaktionen, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme bereitzustellen, bei dem die unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen weitestgehend vermieden werden. Im besonderen ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen bereitzustellen, vorzugsweise von Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden oder Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, insbesondere ein Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme bereitzustellen, welches unter weitestgehender Vermeidung von Folge- oder Nebenreaktionen zu einer selektiven Bildung der Biomoleküle, insbesondere der Insuline bzw. der Insulinanaloga und der zugehörigen, zu Insulinen oder deren Analoga spaltbaren Wertstoffe, führt.

Die Aufgabe wird gelöst durch Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, das sich dadurch auszeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist, welche groß genug sind, daß die Enzyme innerhalb dieser Poren an den Träger binden können.

Die Aufgabe wird ferner gelöst durch ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, ausgewählt aus der Gruppe der Peptide, Proteine, Oligosaccharide oder Polysaccharide, aus deren Vorstufen mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist, welche groß genug sind, daß die Enzyme innerhalb dieser Poren an den Träger binden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist vorzugsweise zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern, insbesondere den Präproinsulinen, mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme geeignet.

Insulinanaloga leiten sich von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin oder tierischen Insulinen, beispielsweise Schweine- oder Rinderinsulin, durch Substitution oder Fehlen wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes und/oder Addition wenigstens eines Aminosäurerestes an A- und/oder B-Kette des natürlich vorkommenden Insulins ab.

Vorzugsweise ist das polymere Trägermaterial ein Copolymerisat aus den Monomeren Methacrylamid und N,N'-bis(methacrylamid), wobei das polymere

Trägermaterial besonders bevorzugt über oxirangruppenhaltige Monomere verfügt.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist das Enzym vorzugsweise mit Hilfe von Oxirangruppen kovalent an das Trägermaterial gebunden.

Bei dem bevorzugten Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern, insbesondere den Präproinsulinen, wird als Enzym vorzugsweise Trypsin verwendet.

Dabei weist das an dem Träger immobilisierte Enzym vorzugsweise eine Aktivität von 0,05 bis 0,5 U/ml auf, der pH-Wert der Reaktionslösung beträgt vorzugsweise 6 bis 10, besonders bevorzugt 7 bis 9.

Im folgenden wird die vorliegende Erfindung insbesondere anhand der Beispiele näher erläutert.

In einer Reihe von Immobilisierungen wurde Trypsin an unterschiedlichen Trägermaterialien kovalent gebunden (Eupergit® C, Eupergit® 250L, Deloxan®).

Der Einsatz dieser Immobilisate bei der Spaltung von Präproinsulin (PPI) lieferte jedoch trotz Variation verschiedener Reaktionsparameter wie z. B. pH-Wert, Temperatur oder Enzymkonzentration die gewünschten Wertstoffe di- bzw. mono-Arg in nur geringer Menge. Stattdessen bildeten sich überwiegend unerwünschte Nebenprodukte wie z.B. des-Thr.

5

Beim Einsatz von Trypsin, das auf dem Träger Eupergit® C1Z, einem porenfreien Träger, immobilisiert wurde, gelang überraschenderweise die PPI-Spaltung nach dem wie beim nativen Einsatz gewünschten Muster.

10

Die Wahl von einem porenfreien Trägers, beispielsweise Eupergit® C1Z, bei der Immobilisierung von Trypsin erlaubt somit erstmalig den wiederholten Einsatz des Enzyms mit gleichzeitig sehr guter Selektivität bei der PPI-Spaltung zu Gunsten der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg. Eine dem semisynthetischen Verfahren analoge Verwendung des immobilisierten Trypsins mit der Konsequenz einer leichten Abtrennbarkeit des Katalysators von der Reaktionslösung sowie eines mehrfachen Einsatzes ist damit für das gentechnische Verfahren zur Herstellung von Humaninsulin möglich.

20

Beispiel 1 Immobilisierung von Proteinen auf polymeren Trägern

Beispiel 1.1 Deloxan®

25

Die Immobilisierung von Proteinen auf Deloxan® setzt eine vorherige Aktivierung des Trägers mit Glutardialdehyd voraus. Bei der eigentlichen Fixierung des Enzyms wurde in einer Meßreihe die aufgegebene native Aktivität des Trypsins variiert.

30

Aktivierung: pH = 9 [KPP: 100 mM]

T = 25 °C

t = 1 h

Deloxan® = 10 g [VR = 150 ml]  
GD = 0.2 g/gTM

Fixierbedingungen: pH = 9 [KPP: 100 mM]

T = 25 °C

t = 3 h

Beispiel 1.2 Eupergit® C250L und Eupergit® C

Bei der Immobilisierung von Trypsin auf Eupergit®-Trägern wird in einer einstufigen Reaktion die Trägersuspension mit der Enzymlösung versetzt.  
Fixierbedingungen für Eupergit® C250L:

10

pH = 8 [KPP: 1 M]

T = 25 °C

t = 3 d

15

Fixierbedingungen für Eupergit® C:

pH = 8,5 [Boratpuffer 100 mM]

T = 25 °C

t = 3 d

Benzamidin = 24 mM

20

25 Beispiel 1.3 Eupergit® C1Z

Der Träger Eupergit® C1Z zeichnet sich im Gegensatz zu den übrigen Trägern durch Porenfreiheit aus.

30 Fixierbedingungen:

pH = 8 [KPP: 1 M]

T = 25 °C

t = 3 d

nat. Trypsin = 7.400 U/gTM [ $\Sigma$  = 37.000 U auf 5 g]

- 5 Unter den gegebenen Bedingungen wird eine spez. Aktivität von 405 U/gTM erzielt. Während die Fixierausbeute mit den Ergebnissen der beiden anderen Eupergit®-Träger vergleichbar ist, liegt die Wiederfindungsrate mit 46 % deutlich höher.

#### Beispiel 2

10

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Deloxan® fixierten Trypsins in einer Konzentration von 0,81 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt.

20

Wie in Fig. 2 zu sehen, entsteht über den betrachteten Zeitraum des-Thr als Hauptprodukt, während die Menge der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg deutlich niedriger liegt.

#### Beispiel 3

25

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C250L fixierten Trypsins in einer Konzentration von 1,62 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen

30

Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt.

- 5 Wie in Fig. 3 zu sehen, entsteht auch in diesem Fall über den betrachteten Zeitraum des-Thr als Hauptprodukt, während die Menge der beiden Wertstoffe di- und mono-Arg, die darüberhinaus in einer Folgereaktion wieder abgebaut werden, deutlich niedriger liegt.

#### Beispiel 4

10

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C1Z fixierten Trypsins in einer Konzentration von 0,081 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 23 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt.

20

Wie in Fig. 4 zu sehen, entstehen im Gegensatz zu den vorherigen Umsetzungsversuchen mit immobilisiertem Trypsin auf der Grundlage dieses Trägers die beiden gewünschten Wertstoffe di- und mono-Arg im Überschuß, während der Anteil der Nebenprodukte (insbesondere des-Thr) drastisch herabgesetzt wird.

#### Beispiel 5

30

In einem Becherglas wird ein Volumen von 1 l der Präproinsulin-Lösung mit einer Konzentration von 0,83 mg/ml vorgelegt. Nach Einstellung von pH 8,3 wird die Spaltreaktion durch Zugabe des auf Eupergit® C1Z fixierten Trypsins in einer

Konzentration von 0,405 U/ml gestartet. Über den gesamten Reaktionszeitraum beträgt die Temperatur der Lösung 6 °C. Der pH-Wert wird während der Umsetzung durch Zugabe von 1 M NaOH-Lösung konstant gehalten. In regelmäßigen Abständen werden über einen Zeitraum von 12 h Proben der Reaktionslösung gezogen und der Gehalt der einzelnen Reaktionskomponenten mittels HPLC bestimmt. Auch in diesem Beispiel entsteht beim Einsatz des auf Eupergit® C12 immobilisierten Trypsins das gewünschte Produkt- und Nebenprodukt-spektrum.

Wie in Fig. 5 zu sehen, kann durch die Verfünffachung der Katalysatorkonzentration die Umsetzungsgeschwindigkeit erhöht und damit die benötigte Reaktionszeit deutlich verkürzt werden, ohne daß sich dadurch die Selektivität der Reaktion zu Ungunsten der beiden Wertstoffe verschiebt.

#### 15 Mögliche Deutung der Ergebnisse der Beispiele 2 bis 5

Beispielsweise im Falle von Präproinsulinen (PPI) handelt es sich bei dem Ausgangssubstrat im Gegensatz zu den Folgeprodukten der Reaktion um eine größeres Molekül ( $\approx 10$  kDa), das einer stärkeren Porendiffusionslimitierung unterliegt. Die Reaktionsgeschwindigkeit aller Folgereaktionen ist aus diesem Grunde größer als die direkte Umsetzung von PPI in unterschiedliche Fragmente. Bei porenbehäfteten Trägern sollte aus diesem Grunde eine Akkumulation des gewünschten Zwischenproduktes P (s. Fig. 6; in diesem Bsp.: di-Arg) nicht möglich sein. Als Lösungsansatz zur Steuerung der Selektivität bietet sich daher der Einsatz porenfreier (bzw. nahezu porenfreier) Träger an.

#### Patentansprüche

5 1. Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist.

10 2. Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, ausgewählt aus der Gruppe der Peptide, Proteine, Oligosaccharide oder Polysaccharide, aus deren Vorstufen mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist.

15 3. Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels eines oder mehrerer an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial keine oder nahezu keine Poren aufweist.

20 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial ein Copolymerisat aus den Monomeren Methacrylamid und N,N'-bis(methacrylamid) ist.

25 5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das polymere Trägermaterial über oxirangruppenhaltige Monomere verfügt.

30 6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mit Hilfe von Oxirangruppen kovalent an das Trägermaterial gebunden ist.

- 10



**Fig. 1: Reaktive Stellen bei der tryptischen Spaltung von Präproinsulin**

(INS = Insulin; AO-Arg-INS = Arg(AO)-Insulin; INS-di-Arg = Arg(B31),Arg(B32)-

10 Insulin; INS-mono-Arg = Arg(B31)-Insulin; des-Thr = Des(B30)-Insulin)

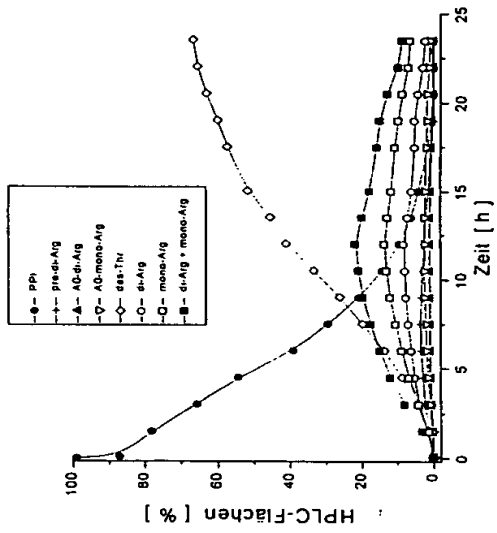


Fig. 2: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Deloxan® immobilisiertem Trypsin

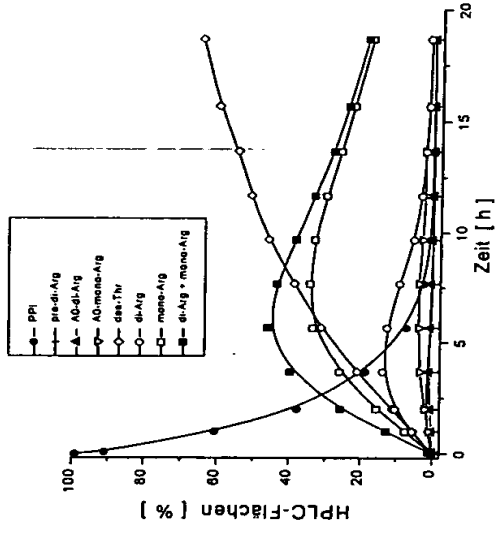


Fig. 3:

Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C259L immobilisiertem Trypsin



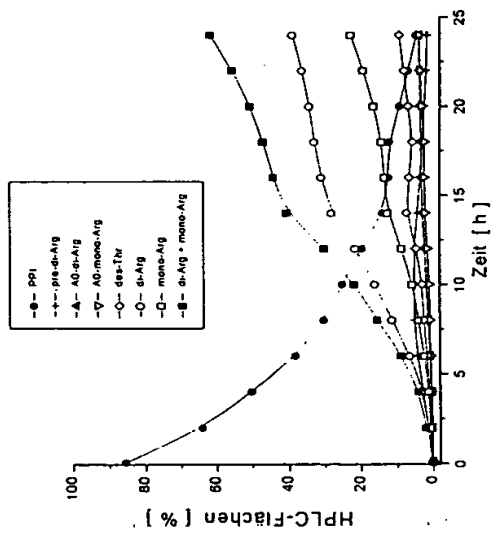


Fig. 4: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C12 immobilisiertem Trypsin

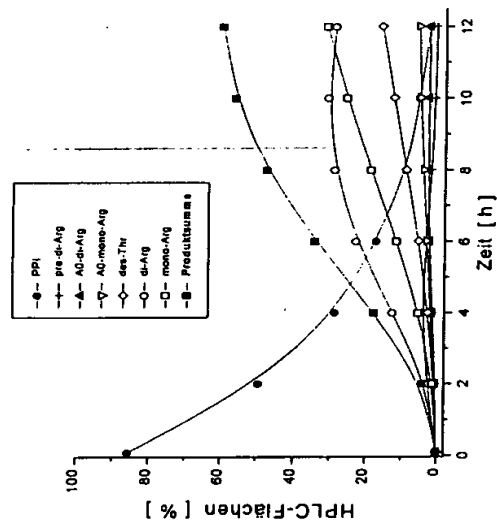
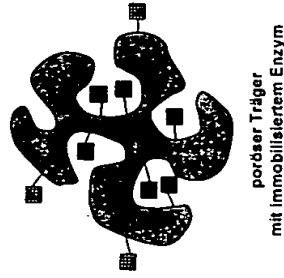
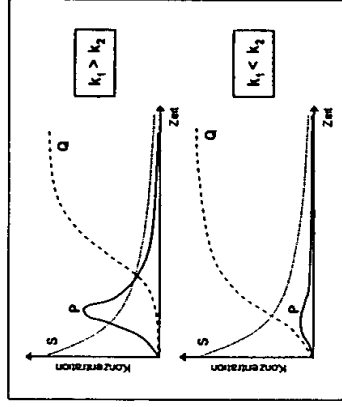
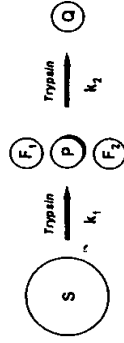


Fig. 5: Verlauf der Konzentrationen der Reaktionskomponenten als Funktion der Zeit bei der Spaltung von Preproinsulin mit auf Eupergit® C12 immobilisiertem Trypsin



10 Fig. 6: Bedeutung der Trägermorphologie für die Selektivität der Reaktion (S = Substrat, z.B. PPI; P = gewünschtes Zwischenprodukt, z.B. Di-Arg; Q = unerwünschtes Folgeprodukt, z.B. des-Thr)

### Zusammenfassung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Katalyse von komplexen Reaktionen großer Moleküle, nämlich enzymkatalysierte Reaktionen, bei welchen in der Regel unerwünschte Folge- oder Nebenreaktionen auftreten, mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, bei dem die unerwünschten Folge- oder Nebenreaktionen durch die Wahl eines porenfreien oder nahezu porenfreien Trägermaterials weitestgehend vermieden werden. Im besonderen betrifft die vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur enzymatischen Gewinnung von Biomolekülen, vorzugsweise von Peptiden, Proteinen, Oligosacchariden oder Polysacchariden, aus deren biologisch nicht aktiven Vorstufen mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, insbesondere ein Verfahren zur Gewinnung von Insulinen oder deren Analoga aus den entsprechenden Vorläufern mittels an einem polymeren Träger gebundener Enzyme, welches infolge der Wahl eines porenfreien oder nahezu porenfreien Trägers unter weitestgehender Vermeidung von Folge- oder Nebenreaktionen zu einer selektiven Bildung der Biomoleküle, insbesondere der Insuline bzw. der Insulinanaloga und der zugehörigen, zu Insulinen oder deren Analoga spaltbaren Wertstoffe, führt.
- 10
- 15
- 20